

氏名	ほっち かずお
学位	発地 和夫
学位記番号	博士 (歯学)
学位授与の日付	新大院博 (歯) 第 421 号
学位授与の要件	平成 17 年 3 月 23 日
博士論文名	学位規則第 3 条第 3 項該当
	An ELISA system for semi-quantitative detection of tissue non-specific alkaline phosphatase and IgG complexes. (組織非特異性アルカリフォスファターゼと IgG 複合体を半定量的に検出するエライザ)
論文審査委員	主査 教授 織田 公光
	副査 教授 高木 律男
	教授 齋藤 力

博士論文の要旨

酵素結合性免疫グロブリンの研究は Wilding らが「Globulin-bound amylase」(1964) を報告してからはじまった。アルカリフォスファターゼ (ALP) においては、長嶺ら (1975) が multiple epiphyseal displasia の患者血清中に ALP-IgG 複合体を発見し報告してから、各国で多くの ALP-免疫グロブリン複合体 (ALP-Ig) の研究がなされた。1980 年代初期に日本電気泳動学会、日本臨床病理学会が中心に、他の酵素も含めて世界の報告例が集計された。それによると、ALP-Ig は悪性疾患、肝疾患、潰瘍性大腸炎、自己免疫疾患に多く検出されている。特に難病に指定されている潰瘍性大腸炎では多く、陽性率は報告者による差もあるが、9.1-33.3% (平均 14.9%) もある。健常者の陽性率 [0.03-0.1% (母集団 1000 人以上)] に比較すると 100 倍以上も高い。また、ALP-Ig の大部分は、肝型 ALP か骨型 ALP と IgG の複合体である。

尚、ヒトの ALP には次の 4 種類のアイソザイムがある。1) 組織非特異性 ALP (tissue non-specific ALP, TNSALP, or liver/bone/kidney ALP, LBK ALP), 2) 小腸型 ALP (intestinal ALP, I-ALP), 3) 胎盤型 ALP (placental ALP, P-ALP), 4) 生殖細胞型 ALP (germ cell ALP, GC-ALP or placenta-like ALP)。このうち、I-ALP, P-ALP, GC-ALP は組織特異性 ALP (tissue specific ALP, TSALP) である。

ALP-Ig の検出法には、免疫電気泳動法、免疫固定電気泳動法、親和電気泳動法、免疫電気向流法などがある。しかし、これらは同時に多検体を処理するには不便な方法であ

る。そこで、我々は ALP-IgG 複合体を ELISA で検出することを試みた。ELISA に使用する TNSALP の一次抗体を作製するために、Saos-2 cell から ALP を以下のようにして精製した。Saos-2 cell を sonication によりホモジナイズして、その 40-60%飽和硫酸分画を調製して、DEAE イオン交換クロマトグラフィーで ALP 活性分画を分離した。PAGE で検討して、主に soluble dimer を含む分画を集めてさらに、Sephacryl S-300 ゲルろ過法で分離して soluble dimer を得た。この分画の ALP (Saos-2 ALP) は熱失活とアミノ酸阻害、さらに分子サイズから TNSALP と確認された。Saos-2 ALP を抗原にして、Kohler と Milstein の方法に準じて抗体の作製を行った。3-29-3R (IgG1 κ), 1C5-32 (IgM κ), 1A5-7 (IgG1 κ) の 3 種類のモノクローナル抗体が得られた。

3-29-3R 抗体は肝型 ALP (L-ALP) に特異性強く、骨型 ALP (B-ALP) にも L-ALP の約 60% の反応性を示した。1C5-32 抗体は Saos-2 ALP に反応性が強く、それよりもやや低いと同程度の反応性を L-ALP と B-ALP に示した。この両者は TSALP には blank レベルの反応性を示した。1A5-7 抗体は L-ALP に強い反応性を示し、その約 50%弱の反応性を Saos-2 ALP と B-ALP に、TSALP には blank レベル以上の反応性を示した。作業を単純にするために当面は 3-29-3R 抗体を使用することにした。

ELISA 法の概略は、microtiter plate を一次抗体の 3-29-3R 抗体 ($2\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ of PBS/well) でコーティング後、 $200\mu\text{l}$ の 1.5%BSA (20mM Tris-HCl pH7.0) でブロックして待機しておく。この microtiter plate を 0.05% Tween を含む (20mM Tris-HCl pH7.0) buffer で洗浄後、検体を各 well に入れて反応後、洗浄して、HRP 標識マウス抗ヒト IgG1 モノクローナル抗体 (第二抗体) を反応させる。洗浄後、HRP の基質 o-phenyldiamine (OPD) 溶液を加えて発色させる。10 分後に反応を停止させて、492nm の吸光度を測定して TNSALP-IgG 複合体の濃度を表現した。上記の ELISA 法で、TNSALP-IgG 複合体を測定して以下の成績を得た。

- 1) 健常人の血清では、 0.195 ± 0.047 ($n=5$)
- 2) 免疫電気向流法で ALP-IgG の含有を確認した血清では、 1.808 ± 0.996
($n=5$)

このように、免疫電気向流法で TNSALP-IgG の含有を確認した血清では、健常人の約 10 倍の濃度であった。本法は TNSALP-IgG を同時多検体処理には有効と思われる。

審査結果の要旨

本研究は血液中に存在するアルカリホスファターゼ(ALP)と免疫グロブリン (Ig) との

複合体 (ALP-Ig 複合体) を定量的に検出する ELISA 法の開発に関するものである。

血液中の ALP の活性は臨床の場において肝臓や骨の疾患の臨床マーカーとして古くから利用されてきた。ヒトの ALP のアイソザイムは 1) 組織非特異型、2) 小腸型、3) 胎盤型、4) 生殖細胞型の 4 種類が知られており、組織非特異型は肝臓、骨、腎臓をはじめ広く体内に分布していることが知られている。そして、血中の ALP の起源は健常者では大部分が肝臓、骨、そして一部が小腸に由来すると考えられる。一方、血液 ALP のザイモグラムによる分析に基づき、移動度の遅い特異的な活性帯 (slow-moving ALP) が出現することが知られていたが、この本態が ALP 結合性の免疫グロブリンによる複合体であること報告された。さらに、複合体に含まれる ALP は組織非特異型であり、抗体もほとんどが免疫グロブリン G であることが判明している。ALP-Ig 陽性患者での血清の全 ALP 活性は、正常域の上限を中心として分布しており、やや高めの傾向を示すものの著しい高値は知られていない。また、その出現頻度は 0.1% 前後が一応の目安として考えられている。疾患との関連では消化器疾患 (潰瘍性大腸炎、慢性肝疾患)、悪性腫瘍、自己免疫疾患に出現する頻度が高い。特にその発見の端緒となった潰瘍性大腸炎は ALP-Ig 陽性患者の最多疾患 (一部の統計では 17%) であることが明らかになっているが、ただし、その全てに ALP-Ig 複合体が検出されるわけではない。ALP-Ig 出現の機序はまだ明らかになっていないが、種々の報告からは自己免疫的機序が推測されており、また加齢とともに出現頻度が上昇することから加齢、およびそれにもなう免疫系の機能減弱との関連も考えられる。また、経過との関連では潰瘍性大腸炎の活動期に出現し、緩和期には消失するとの報告もなされており、この消失が何を意味するのかは今後の課題である。以上のような背景の下に、従来のポリアクリルアミド電気泳動法や免疫電気向流法に代わって ALP-Ig 複合体を迅速に感度よく分析する方法の開発が待たれていた。

本研究で用いられた抗体はヒト由来の骨肉腫細胞 (Saos-2) から部分精製した組織非特異型酵素を抗原にして得られたモノクローナル抗体であり、まずこの抗体を吸着させた microtiter plate に被検者の血液を加えて血液中の ALP を捕捉する。次に、洗浄後、HRP 標識のマウス抗ヒトモノクローナル抗体 (市販) を加えることで ALP に結合した IgG (ALP-Ig 複合体) を検出するものである。本 ELISA 法に関しては同じ検体をそのつど免疫電気向流法を用いて ALP-Ig 複合体の有無を確認しており、信頼性が高いと評価された。また、反応の直線性からも定量性も兼ね備えていることが明らかとなった。本 ELISA 法が潰瘍性大腸炎をはじめとする疾患の診断や治療の過程はもとより ALP-Ig 出現の機序の解明に今後寄与すると考えられ博士論文としての価値を認める。